

⑯  
⑯  
⑯  
⑯**Offenlegungsschrift 25 07 223**

Aktenzeichen: P 25 07 223.5-44  
Anmeldetag: 20. 2. 75  
Offenlegungstag: 2. 9. 76

⑯

Unionspriorität:

⑯ ⑯ ⑯

⑯

Bezeichnung: Produkt erhältlich aus Kollagen und Verfahren zu dessen Herstellung

⑯

Anmelder: Fa. H. Trommsdorff, 5110 Alsdorf

⑯

Erfinder: Hadhanyi, Andreas, Dipl.-Chem., 5110 Alsdorf;  
Mohanaradhakrishnan, Venugopala, Dr., 5100 Aachen

Prüfungsantrag gem. § 28b PatG ist gestellt

# H. TROMMSDORFF

Arzneimittelabteilung Anschrift: Postfach 1797

2507223

Tel.: 02404/4893 -  
Telex: 8 329 581 trom

## Produkt erhältlich aus Kollagen und Verfahren zu dessen Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Produkt erhältlich aus Kollagen, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie Arzneimittel und kosmetische Mittel, die dieses Produkt enthalten.

Kollagen ist ein Eiweißstoff, dessen Eigenschaften zum größten Teil bekannt sind ( TRAUB, W. und PIEZ, K.A. in Advanc. Prot. Chem., 25, 243, Academic Press, New York (1971); VIIDIK, A., Intern. Rev. Conn. Tissue Res., 6, 127, Academic Press, New York (1973); RAMACHANDRAN, G.N., und HODGE, A.G., in "Treatise on Collagen", Vol. 1, S. 103 und 185, Academic Press, London (1967)). Es ist bereits versucht worden, Kollagen zur Heilung von Wunden zu verwenden. Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch sehr wechselhaft und nicht reproduzierbar.

In nativem Zustand besteht das Kollagen aus drei Ketten ( 2  $\alpha_1$ -Ketten, 1  $\alpha_2$ -Kette), die helixartig ineinander gebunden sind und die durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Dieses Kollagen wird im Folgenden als "monomeres Kollagen" bezeichnet. Einige oder eine ganze Reihe von "Molekülen" des monomeren Kollagens können sich durch kovalente Bindungen miteinander verbinden, wodurch sogenanntes "polymeres Kollagen" ( enthaltend 2 bis etwa 4 Kollagen-

Einheiten) und "hochpolymeres Kollagen" ( enthaltend mehr als 4 Kollagen-Einheiten) entsteht.

Es wurde nun gefunden, daß es zur Erzielung einer guten Wirkung mit Kollagen entscheidend darauf ankommt, daß in den Kollagen enthaltenden Präparaten ein bestimmtes Verhältnis von monomerem : polymerem : hochpolymerem Kollagen eingehalten wird.

Gegenstand der Erfindung ist ein Produkt, welches 25 - 50 Teile monomeres, 25 - 50 Teile polymeres und 0 - 40 Teile hochpolymeres Kollagen in einem Puffer enthält.

Gegenstand der Erfindung ist weiter ein Verfahren zur Herstellung des Produktes, welches darin besteht, daß man

- a) Kollagen in einer Alkalialsalzlösung, die eine Hexose oder Glycerin enthält, bei niedriger Temperatur röhrt und die unlöslichen Bestandteile abtrennt, wobei man eine Lösung I, die monomeres Kollagen enthält, und einen Rückstand A erhält,
- b) den Rückstand A in 0,01 - 1,0 molarer Säure unter Zusatz von 0,05 - 3%  $\alpha$ -Ketoglutarsäure bei Raumtemperatur röhrt und anschließend die unlöslichen Bestandteile abtrennt, wobei man einen Überstand II, der polymeres Kollagen enthält, und einen Rückstand B erhält,
- c) den Rückstand B in einer wässrigen Lösung, die 0,2 bis 8 Mol Urethan und gegebenenfalls 0,3 bis 8 Mol Harnstoff pro Liter enthält, oder in Trispuffer ( pH 4,0 bis 8,0 ), der 0,05 bis 0,5 Mol/l Calciumchlorid enthält, röhrt und zentrifugiert, wobei man das hochpolymere Kollagen im Überstand III erhält, und

d) die Überstände I, II und III getrennt durch Dialyse gegen Wasser oder mit Natriumchlorid ausfällt, die Niederschläge einzeln in einem physiologisch verträglichen Puffer (pH 2 - 7) auflöst, und die Lösungen so mischt, daß das Verhältnis der Bestandteile I, II und III zueinander ( 25 bis 50 ) : ( 25 bis 50 ) : ( 0 bis 40 ) beträgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zu der so erhaltenen Lösung Prolin zugesetzt, so daß der Gesamtprolin-gehalt bis zu 40 %, vorzugsweise 30 %, bezogen auf den Gesamtgehalt an Aminosäuren nach der Hydrolyse, beträgt.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich Arzneimittel und kosmetische Mittel, die das neue Kollagen-Produkt enthalten.

Als Ausgangsmaterial kann handelsübliches Kollagen verwendet werden. Dieses ist stets ein Gemisch von monomerem, polymerem und hochpolymerem Kollagen. Am besten eignet sich ein Kollagen mit einem möglichst hohen Anteil an Monomerem, welches aus jungen Tieren gewonnen werden kann. Bei Kollagen aus alten Tieren kann der Anteil an Monomerem so gering sein, daß eine Aufarbeitung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren unwirtschaftlich wird.

Es kann zweckmäßig sein, das als Ausgangsmaterial verwendete Kollagen einem Reinigungsschritt zu unterziehen, bevor man es gemäß der Erfindung aufarbeitet. Die Reinigung kann dadurch erfolgen, daß man aus den Kollagenen Verunreinigungen z.B. mit einer Kochsalzlösung, die einen Komplexbildner enthält, extrahiert.

Der erste Reaktionsschritt a) wird zweckmäßig bei 2 - 8°C durchgeführt. Die Alkalosalz-Konzentration sollte nicht unter 0,01 Mol/l liegen, nach oben ist keine Grenze gesetzt.

Als Hexosen kommen insbesonders Glucose, Fructose und Galactose in Betracht, die vorzugsweise in einer Menge von 0,05 bis 0,5 Mol/l verwendet werden. Geeignete Säuren für den Schritt b) sind z.B. Schwefelsäure, Phosphorsäure, Ameisensäure, Bernsteinsäure, Oxalsäure u.dgl. Besonders geeignet sind Essigsäure und Milchsäure. Für den Schritt c) kommen als Urethane solche mit niederen Alkylgruppen, besonders Äthylurethan, in einer Menge von normalerweise 0,2 - 5,0, vorzugsweise 1,5 - 2,5, Mol/l in Betracht. Es hat sich als günstig erwiesen, zusätzlich Harnstoff in einer Menge von 0,3 - 8,0, vorzugsweise 0,5 - 1,5, Mol/l zu der Urethanlösung zuzugeben. Der für d) verwendete Puffer sollte einen pH-Wert von 2 - 7 besitzen und 0,01 bis 1,0 molar sein. Zu seiner Herstellung können alle geeigneten Salze und Säuren verwendet werden, die physiologisch verträglich sind. Besonders geeignet sind Acetat- und Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 3,5 bis 6,0.

Es empfiehlt sich, zu der erhaltenen Lösung ein Antibiotikum zuzusetzen, um die Haltbarkeit zu erhöhen. Es können auch weitere Substanzen wie z.B. Vitamine (Ascorbinsäure), Aminosäuren (Glycin, DL-Threonin, L-Cystein) oder Cu-, Zn- und Eisensalze zugesetzt werden.

Das neue, aus Kollagen erhältliche Produkt eignet sich sehr gut zur Behandlung offener Wunden, weil es die Wundgranulation stark anregt. Auch für kosmetische Zwecke ist es wegen seiner feuchtigkeitsspendenden und reparativen Wirkung gut verwendbar.

Beispiel 1

. 5 .

I. Vorreinigung des Kollagens

6 kg Kollagen werden in 20 l deionisiertem Wasser, in dem 4 % EDTA (800 g) und 1 % NaCl (200 g) gelöst sind, bei 4°C 24 Stunden gerührt. Danach wird zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

II. Herstellung des Endproduktes

- a) Das vorgereinigte Kollagen (5,5 kg) wird in 100 l Wasser, in dem 1 kg Glucose und 1,5 kg NaCl gelöst sind, 24 Stunden bei 4°C gerührt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand (I) wird aufbewahrt (80 l).
- b) Der Rückstand (2,5 kg) wird mit 40 l 0,05 M Essigsäure, in der 0,5 % (200 g)  $\gamma$ -Ketoglutarsäure enthalten sind, 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand (II) wird aufbewahrt (35 l).
- c) Der Zentrifugerrückstand (1,5 kg) wird in 25 l Wasser, in dem vorher 1,5 kg Harnstoff und 1,125 kg Äthylurethan gelöst sind, 24 Stunden bei 4°C gerührt. Danach wird wieder zentrifugiert und der Überstand (III) (20 l) aufbewahrt. Der Rückstand (400 g) wird verworfen.
- d) Die Überstände I, II und III werden getrennt gegen Wasser dialysiert (40 Stunden bei 15°C). Die ausgefallenen Kollagenfasern werden abgetrennt, in 0,1 M Zitratpuffer (pH 4,0) bei 4°C aufgenommen (I in 45 l, II in 15 l, III in 16,5 l) und zentrifugiert.

Es werden 40 Teile I, 40 Teile II und 20 Teile III zusammengemischt und anschließend mit dem Zitratpuffer 1:10 verdünnt. Die Gesamtkonzentration an I, II und III im Endprodukt liegt ... bei etwa 0,6 %. Der Gehalt an Prolin beträgt nach der Hydrolyse 15,7 % bezogen auf den Gesamtgehalt an Protein.

Beispiel 2

2507223

Das Beispiel 1 wurde wiederholt, jedoch wurde in Schritt c) der Zentrifugierückstand in 25 l 0,2 M Trispuffer ( pH 7,0 ), der 0,1 Mol/l  $\text{CaCl}_2$  enthielt, gerührt.

Die Ausbeute war dieselbe wie in Beispiel 1.

Beispiel 3

- a) 5 kg Kollagen werden in 40 l Wasser, in dem 1,136 kg Dinatriumhydrogenphosphat und 4 kg Glycerin gelöst sind, bei 8°C 24 Stunden gerührt und zentrifugiert. Der Überstand I wird aufbewahrt. ( 30 l )
- b) Der Rückstand (3,5 kg) wird mit 30 l 0,5 M Milchsäure und 300 g  $\gamma$ -Ketoglutarsäure 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand II (20 l) wird aufbewahrt.
- c) Der Zentrifugierückstand (2,2 kg) wird in 25 l Wasser, in dem vorher 9 kg Äthylurethan gelöst wurden, 24 Stunden bei 4°C gerührt. Danach wird zentrifugiert und der Überstand III aufbewahrt. ( 20 l )
- d) Die Überstände I ( 30 l ), II ( 20 l ) und III ( 20 l ) werden getrennt mit NaCl gesättigt und bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Die ausgefallenen Kollagene werden einzeln filtriert, mit kleinen Mengen Wasser gewaschen, gewogen und in je 5 l 0,1 M Zitratpuffer ( pH 4,5 ) gelöst. Die Lösungen I, II und III werden so gemischt, daß das Gemisch monomeres (I), polymeres (II) und hochpolymeres (III) Kollagen im Verhältnis 45 : 45 : 10 enthält.

Der Gehalt an Prolin beträgt nach der Hydrolyse 16,4 % bezogen auf den Gesamtgehalt an Protein.

Die nach den Beispielen 1, 2 und 3 erhaltenen Kollagenprodukte lassen sich direkt für medizinische und kosmetische Zwecke verwenden. Weitere Beispiele für medizinische und kosmetische Zusammensetzungen sind die folgenden:

A. 100 ml Lösung gemäß Beispiel 1

0,19 g L-Prolin  
1,0 g Neomycinsulfat

B. 100 ml Lösung gemäß Beispiel 2

0,22 g L-Prolin  
0,5 g Glycin  
0,5 g D,L-Threonin  
0,5 g L-Cystein  
1,0 g Neomycinsulfat

C. 100 ml Lösung gemäß Beispiel 3

0,23 g L-Prolin  
0,5 g Glycin  
0,5 g D,L-Threonin  
0,5 g L-Cystein  
0,1 g Ascorbinsäure  
1,0 g Zn-Salz  
0,5 g Neomycinsulfat  
0,5 g Bacitracin

Patentansprüche

1. Produkt erhältlich aus Kollagen, dadurch gekennzeichnet, daß es 25 - 50 Teile monomeres, 25 - 50 Teile polymeres und 0 - 40 Teile hochpolymeres Kollagen in einem Puffer enthält.
2. Produkt gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich Prolin enthält, so daß der Gesamtgehalt an Prolin bis zu 40 % beträgt.
3. Verfahren zur Herstellung des Produktes gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) Kollagen in einer Alkalisalzlösung, die eine Hexose oder Glycerin enthält, bei niederer Temperatur röhrt und die unlöslichen Bestandteile abtrennt, wobei man eine Lösung I, die monomeres Kollagen enthält, und einen Rückstand A erhält,
  - b) den Rückstand A in 0,01 - 1,0 molarer Säure unter Zusatz von 0,5 bis 3 %  $\alpha$ -Ketoglutarsäure bei Raumtemperatur röhrt und anschließend die unlöslichen Bestandteile abtrennt, wobei man einen Überstand II, der polymeres Kollagen enthält, und einen Rückstand B erhält,
  - c) den Rückstand B in einer wässrigen Lösung, die 0,2 bis 8 Mol Urethan und gegebenenfalls 0,3 bis 8 Mol Harnstoff pro Liter enthält, oder in Trispuffer (pH 4,0 bis 8,0), der 0,05 bis 0,5 Mol/l Calciumchlorid enthält, röhrt und zentrifugiert, wobei man das hochpolymere Kollagen im Überstand III erhält, und
  - d) die Überstände I, II und III getrennt durch Dialyse gegen Wasser oder mit Natriumchlorid ausfällt, die Niederschläge einzeln in einem physiologisch

verträglichen Puffer ( pH 2 - 7 ) suspendiert und die Lösungen so mischt, daß das Verhältnis der Bestandteile I, II und III zueinander ( 25 bis 50 ) : ( 25 bis 50 ) : ( 0 bis 40 ) beträgt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zu der erhaltenen Lösung Prolin zugibt, so daß der Prolinegehalt bis zu 40 %, vorzugsweise 30 %, bezogen auf den Gesamtgehalt an Aminosäuren nach der Hydrolyse, beträgt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zu der erhaltenen Lösung 0,1 - 5 %, vorzugsweise 1 %, Glycin und/oder Cystein und/oder Threonin zufügt.
6. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zu der erhaltenen Lösung 0,01 bis 2 % Zink und /oder Kupfer und/oder Eisensalze zufügt.
7. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zu der erhaltenen Lösung 0,5 - 2 %, vorzugsweise 1 %, Antibiotika wie z.B. Neomycinsulfat oder Bacitracin zufügt.
8. Arzneimittel enthaltend Produkte gemäß Anspruch 1 oder 2.
9. Kosmetische Mittel enthaltend Produkte gemäß Anspruch 1 oder 2.